



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—××××

核酸适配体亲和性和特异性评价技术导则

Technical guidance for affinity and specific of aptamer

××××-××-×× 发布

××××-××-×× 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院归口。

本标准起草单位：河北省食品检验研究院、中国标准化研究院、江南大学、合肥工业大学、中国科技大学、河北农业大学、西南大学、浙江工商大学、河南大学、北京食品科学研究院、河北医科大学。

本标准主要起草人：张岩、周巍、马爱进、王周平、瞿昊、罗昭锋、郑磊、王向红、陈佳、马良、田益玲、王赞、张雅伦、张涛、康文艺、王彦波、傅玲琳、孙勇、陈伟、吕品。

核酸适配体亲和性和特异性评价技术导则

1 范围

本标准规定了核酸适配体与目标物结合亲和性和特异性的评价规则和测定方法。
本标准适用于金属离子、小分子、大分子、细胞及颗粒物、组织以及混合目标物等不同层次目标物体系的核酸适配体的亲和性和特异性评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

亲和性 affinity

特定目标物与核酸适配体之间相适应而存在的引力,它是特定目标物与核酸适配体固有的结合力。
注:亲和性的强弱,一般以平衡解离常数 K_D 来表示。

3.2

特异性 specificity

相同测定方法、相同物质的量浓度等条件下,测定核酸适配体对目标物及其非目标物的结合数量比。
注:当结合数量比值越高,说明特异性越好。

3.3

平衡解离常数 dissociation constant

核酸适配体与目标物结合达到解离平衡时各产物浓度的幂函数的乘积除以反应物浓度的幂函数。
注:绝大多数情况下,核酸适配体与目标物是 1:1 结合,核酸适配体的平衡解离常数可以简化为溶液中游离状态的核酸适配体浓度与游离状态的目标物物质浓度的乘积再除以两者复合物的浓度。数值上等于目标物物质被核酸适配体结合一半时目标物物质的浓度(K_D)。 K_D 值越小,表明两者相互作用越强。

$$K_D = \frac{c_A c_T}{c_E}$$

式中:
 K_D ——平衡解离常数;
 c_A ——核酸适配体的物质的量浓度;
 c_T ——目标物分子物质的量浓度;
 c_E ——复合物的物质的量浓度。

4 评价规则

4.1 亲和性

用核酸适配体与目标物结合的平衡解离常数(K_D)来表示核酸适配体与目标物亲和性的强弱。 K_D 值越低表明其亲和性越强。金属离子、小分子与核酸适配体复合物的 K_D 值一般在数十纳摩尔每升至微摩尔每升范围之内;大分子、细胞、组织与核酸适配体复合物的 K_D 值一般在皮摩尔/升至纳摩尔每升范围之内。

4.2 特异性

给定条件下分别测定核酸适配体对目标物及其非目标物的结合数量比。对不同非目标物具有不同的特异性,当比值大于 3 时一般认为具有特异性。

5 测定方法

5.1 测定方法质量控制

测试过程应添加阴性对照,包括目标物的阴性对照和核酸适配体的阴性对照。目标物的阴性对照尽量选择与目标物结构类似、来源相近的非目标物;核酸适配体的阴性对照建议选择碱基数量相同的无意义序列或筛选时获取的低亲和性序列;至少选择两种原理不同的方法进行比对,使用时要特别注意每种方法的基本原理及适用范围。

5.2 亲和性测定方法

5.2.1 无需复合物与未结合适配体分离的测定方法

无需复合物与未结合适配体分离是指不需要将复合物从检测体系中分离出来,根据相应测试信号变化实现亲和性测定。此类方法适用于结合前后产生光谱信号或热量变化与目标物或核酸适配体浓度呈正相关性的体系。方法包括荧光光谱法、紫外吸收法、等温滴定微量热法、微量热泳动法等。荧光光谱法、紫外吸收法多适用于金属离子、小分子测定;等温滴定微量热法、微量热泳动法多适用于小分子、大分子测定。

5.2.2 需要复合物与未结合适配体分离的测定方法

需要复合物与未结合适配体分离是指需要将复合物从检测体系中分离出来,根据相应测试信号变化实现亲和性测定。此类方法适用于只有通过分离才能实现复合物定量的体系。方法包括荧光光谱法、微球分离法、流式细胞术、酶联核酸适配体法、表面等离子体共振法、生物膜干涉法、毛细管电泳、凝胶阻滞电泳等分子互作分析方法。荧光光谱法多适用于细胞、组织等的测定;流式细胞术多适用于大分子、细胞等的测定;酶联核酸适配体法多适用于小分子、大分子、细菌、病毒等的测定;表面等离子体共振法、生物膜干涉法多适用于小分子、大分子和细胞等的测定;毛细管电泳、凝胶阻滞电泳多适用于大分子和细胞等的测定;微球分离法多结合荧光光谱、荧光定量聚合酶链式反应(PCR)等适用于小分子、大分子等的测定。

5.3 特异性测定方法

相同条件下(相同测定方法、相同物质的量浓度等条件)根据 5.2 的方法进行测定,计算核酸适配体对目标物及其非目标物的结合数量比。

6 防污染措施

检测过程用水规格和试验方法按照 GB/T 6682 中的规定执行,防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 中的规定执行。
